

PCT/JP00/05582

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

21.08.00

10/049986

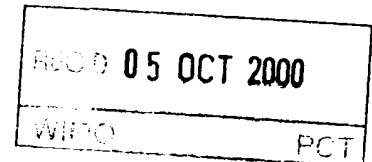
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年 8月20日



出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第233647号

出 願 人

Applicant (s):

永森 静志  
宮村 達男

4

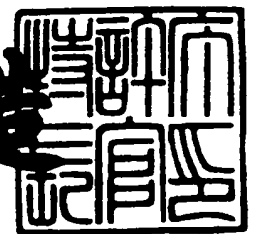
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 9月22日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2000-3075962

【書類名】 特許願

【整理番号】 99603

【提出日】 平成11年 8月20日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12M 3/00

【発明者】

【住所又は居所】 東京都港区西新橋三丁目 2 5 番 8 号 東京慈恵会医科大学  
学内

【氏名】 永森 静志

【特許出願人】

【住所又は居所】 東京都港区西新橋三丁目 2 5 番 8 号 東京慈恵会医科大学  
学内

【氏名又は名称】 永森 静志

【特許出願人】

【住所又は居所】 東京都新宿区戸山一丁目 2 3 番 1 号 国立感染症研究所  
内

【氏名又は名称】 宮村 達男

【代理人】

【識別番号】 100088546

【弁理士】

【氏名又は名称】 谷川 英次郎

【電話番号】 03(3238)9182

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 053235

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

特平 11-233647

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 肝炎ウイルスの増殖方法及び装置

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 粒子状の多孔性担体上に肝細胞を担持させたものを収容するバイオリアクター本体の周縁部から中心部に向けて培養液を流通させるラジアルフロー型肝細胞バイオリアクター中に維持された前記肝細胞に肝炎ウイルスを感染させ、引き続きバイオリアクター本体の周縁部から中心部に向けて培養液を流通させて前記肝細胞を培養し、それによって前記感染された肝炎ウイルスを前記肝細胞中で増殖させることを含む、肝炎ウイルスの増殖方法。

【請求項 2】 前記肝細胞は樹立細胞株である請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】 前記樹立細胞株は FLC-4 株 (FERM BP-5165) である請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】 肝炎ウイルスの感染は、前記培養液中に肝炎ウイルスを添加することにより行われ、肝炎ウイルスを培養液に添加後、新鮮な培地を供給せずに、使用した培地を循環させ、次いで、培養液の流通を停止し、次いで、新鮮な培地を供給せずに、使用した培地を循環させて培養する工程を含む請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】 肝炎ウイルスを培養液に添加する前に、新鮮な培地の供給速度及び酸素供給速度をそれまでの速度よりも大きくする請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】 前記肝炎ウイルスは C 型肝炎ウイルスである請求項 1 ないし 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】 周縁部から中心部に向けて培養液を流通させることができるバイオリアクター本体と、該バイオリアクター本体の周縁部に培養液を供給する培養液供給路と、該バイオリアクター本体の内部に収容され、その上に肝細胞が担持される粒子状の多孔性担体と、該バイオリアクター本体の内部に位置し、培養液をバイオリアクター本体から排出する培養液排出路とを具備したラジアルフロー型肝細胞バイオリアクターから成る肝炎ウイルスの増殖装置。

【請求項 8】 C 型肝炎ウイルスの増殖装置である請求項 7 記載の増殖装置

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、C型肝炎ウイルス（HCV）等の肝炎ウイルスの増殖方法に関する

【0002】

【従来の技術】

HCVは1989年にcDNAがクローニングされ、その後各種発現系を駆使してその構造及びプロセッシング機構が明らかにされてきた。その結果、非常に有効な診断系が開発され、我が国におけるHCVによる輸血後肝炎は現時点ではほぼ制圧された。

【0003】

以上のように、HCVの全容は明らかになりつつあるが、遺伝子レベルの研究が先行し、未だにウイルスの複製、粒子形成、変異等の生物学及び発癌機構の解明などの基礎的な研究は進んでおらず、HCVのワクチン、プロテアーゼ阻害剤、アンチセンス等の薬剤による治療法の開発も進展していない。これは、生体外におけるHCVの増殖系が未だに存在しないことに起因する。HCVを培養肝細胞中で増殖させることは非常に困難なことであり、未だかつてこれに成功したという報告はない。従って、現在、上記の研究にはチンパンジーを用いるしか方法がない。しかし、これは非常に高価であり、個体差や再現性にも問題がある。また、動物愛護の点からもその利用には限界がある。このような背景から、臨床治験や動物実験に依存しない培養細胞を用いたHCVの増殖系の確立が望まれている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

従って、本発明の目的は、培養肝細胞を用いた、HCV等の肝炎ウイルスの増殖方法を提供することである。

【0005】

## 【課題を解決するための手段】

本願発明者は、鋭意研究の結果、ラジアルフロー型バイオリアクター内で肝細胞を培養し、これにHCVを感染させ、肝細胞の培養を継続することによりHCV等の肝炎ウイルスを増殖させることが可能であることを見出し本発明を完成した。

## 【0006】

すなわち、本発明は、粒子状の多孔性担体上に肝細胞を担持させたものを収容するバイオリアクター本体の周縁部から中心部に向けて培養液を流通させるラジアルフロー型肝細胞バイオリアクター中に維持された前記肝細胞に肝炎ウイルスを感染させ、引き続きバイオリアクター本体の周縁部から中心部に向けて培養液を流通させて前記肝細胞を培養し、それによって前記感染された肝炎ウイルスを前記肝細胞中で増殖させることを含む、肝炎ウイルスの増殖方法を提供する。また、本発明は、周縁部から中心部に向けて培養液を流通させることができるバイオリアクター本体と、該バイオリアクター本体の周縁部に培養液を供給する培養液供給路と、該バイオリアクター本体の内部に収容され、その上に肝細胞が担持される粒子状の多孔性担体と、該バイオリアクター本体の内部に位置し、培養液をバイオリアクター本体から排出する培養液排出路とを具備したラジアルフロー型肝細胞バイオリアクターから成る肝炎ウイルスの増殖装置を提供する。

## 【0007】

## 【発明の実施の形態】

本発明の方法では、ラジアルフロー型バイオリアクターを用いて肝細胞を培養する。まず、このラジアルフロー型バイオリアクターの好ましい一例を図面に基づいて説明する。

## 【0008】

図1には、好ましいラジアルフロー型バイオリアクターの一例が模式的に示されている。図1の上側の図はラジアルフロー型バイオリアクターの模式縦断面図であり、下側の図はラジアルフロー型バイオリアクターの模式横断面図である。ラジアルフロー型バイオリアクター10は、円筒状のバイオリアクター本体12を含む。バイオリアクター本体12の外周壁は多数の貫通孔を有する多孔性材料

から成り、これらの貫通孔を通して培養液がバイオリアクター本体の外側から内側に流通できるようになっている。孔の直径は、後述する担体粒子よりも小さく、かつ、バイオリアクター本体 12 内に培養液を十分に供給できる大きさであり、通常  $20 \sim 80 \mu\text{m}$  程度が好ましい。断面がバイオリアクター本体 12 と同心円状となるようにバイオリアクター本体 12 のさらに外側を囲包する、円筒状のケーシング 14 が設けられており、バイオリアクター本体 12 の外周壁と、該ケーシング 14 との間には、環状の培養液供給路 16 が形成される。培養液供給路 16 は、その底部において、培養液供給管 18 と連通している。バイオリアクター本体 12 の中心部には、培養液排出管 20 が設けられている。培養液排出管 20 の外周壁も、バイオリアクター本体 12 と同様な大きさの貫通孔を多数有する多孔性材料から成り、培養液は流通できるが、担体は通過できない。

## 【0009】

さらに、バイオリアクター本体 12 の内部には、粒子状の多孔性担体 22 が多数収容されている。多孔性担体の材料としては、特に限定されないが、好ましい例として球状の多孔性ガラスビーズを挙げることができる。多孔性担体の直径は、特に限定されないが  $0.1\text{mm} \sim 6\text{mm}$  程度が好ましく、特に  $0.3\text{mm} \sim 1.2\text{mm}$  程度が好ましい。また、担体中の孔径は特に限定されないが  $10 \sim 300 \mu\text{m}$  程度が好ましく、特に  $20 \sim 120 \mu\text{m}$  程度が好ましい。また、担体粒子内の空隙率は、特に限定されないが  $30 \sim 70\%$  程度が好ましく、特に  $40 \sim 60\%$  程度が好ましい。このような多孔質ガラスビーズは、ドイツ国 Schott glasswerk Co. Ltd. から Siran の商品名で市販されており、この市販品を好ましく用いることができる。また、バイオリアクター本体 12 内に収容される担体粒子の密度は、特に限定されないが、バイオリアクター本体内に粒子を重力下でできるだけ多量に注ぎ込むことが好ましい。

## 【0010】

上記のラジアルフロー型バイオリアクターのサイズは特に限定されず、バイオリアクター本体 12 内の容積は、通常、 $5\text{ml} \sim$  数十リットル程度であるがこの範囲外でも差し支えない。

## 【0011】

次に上記のようなラジアルフロー型バイオリアクターを用いた肝細胞の培養方法について説明する。培養液の流れは図1において矢印で示されている。すなわち、培養液は培養液供給管18を通じてバイオリアクター本体12の外周部にある培養液供給路16に底部から供給される。培養液は、培養液供給路16を上方に向かって流通するが、バイオリアクター本体12の外壁に設けられている多数の貫通孔からバイオリアクター本体12の内部に進入する。そして、バイオリアクター本体12内を中心に向かって流れ、培養液排出管20に設けられた多数の貫通孔から培養液排出管20内に入り、培養液排出管20内を上方に向かって移動し、培養液排出管20の頂部からバイオリアクター本体12の外部に排出される。なお、図1に示されるラジアルフロー型バイオリアクターでは、培養液は底部から供給されるが、バイオリアクター本体12の外周部から中心部に向かって培養液が流れればよいので、培養液を培養液供給路16の頂部から供給する構成としてもよい。また、排出された培養液の一部は再度循環させて培養液として供給することが好ましい。すなわち、培養液としては、新鮮な培養液と、リサイクルされた培養液の混合物を用いることが好ましい。これらの混合割合は、一日のグルコース消費量(g/日)/酸素消費量(g/日)比率が0.5~15、特には3~10程度になるように自動制御することが好ましい。

#### 【0012】

ここで使用される培養液は、肝細胞を培養し増殖させることができるものであればどのような組成のものでもよく、市販の培養液を用いることもできる。培養液の好ましい例として、次の組成(単位は全てmg/L)を有するものを挙げることができる。NaCl 6000, KCl 400,  $MgCl_2$  100,  $MgSO_4$  98,  $NaH_2PO_4$  125,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.8,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.01,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0.001, D-グルコース2000, D-マンノース 500, L-アスパラギン塩酸塩200, D-ガラクトース 200, L-アラニン 20, アラニル-L-グルタミン500, L-アスパラギン酸 20, L-グルタメート 20, グリシン30, グリシル-L-グルタミン500, L-イソロイシン 105, L-リジン 146, L-フェニルアラニン 67, L-セリン 80, L-オルニチン 100, L-スレオニン 95, L-トリプトファン 25, L-チロシン 64, L-バリン94, コハク酸106, ウリジン5, コリン二酒石酸(choline bitartrate) 20, 葉酸4, イノシトール20, 塩酸ピリドキサル4

、リボフラビン0.4、ビルビン酸ナトリウム110、グリセロリン酸1500、HEPES 1200、 $\text{NaHCO}_3$  1800、ヒトトランスフェリン5、インシュリン5、フェノールレッド5。また、これに1～3%程度の、ウシ胎児血清等の血清を添加したものも好ましく用いることができる。培養液中の酸素濃度及びpHを調整することが好ましい。培養液中の酸素濃度は排出培養液中の酸素濃度が1 ppm以上となるように調整することが好ましい。すなわち、バイオリアクター本体の容積1 ml 当たり、酸素供給量は0.025～0.75 ml / 分、特に0.05～0.5 ml / 分程度が好ましい。また、新鮮な培養液の供給速度は、特に限定されないが、バイオリアクター本体の容積1 ml 当たり、通常、0.25～100 ml / 日程度、好ましくは0.5～50 ml / 日程度である。また、培養液の循環速度は、特に限定されないが、バイオリアクター本体の容積1 ml 当たり、通常、0.25～2.0 L / 日、好ましくは0.5～1.0 L / 日程度である。培養液のpHは、水酸化ナトリウム溶液や二酸化炭素等を用いて約7.0に調整することが好ましい。さらに、培養液の温度は、約37℃に調整することが好ましい。

#### 【0013】

肝細胞は、上記した多孔性担体の表面及び多孔性担体中の孔の内部表面に付着して増殖する。増殖した肝細胞は、多孔性担体の表面及び孔の内部表面に担持され、さらに多孔性担体間の空隙にも充填される。肝細胞の多孔性担体への付着及び増殖は、培養液中に肝細胞を添加した、肝細胞浮遊液を上記培養液としてラジアルフロー型バイオリアクター内に供給することにより達成することができる。肝細胞浮遊液を培養液として供給すると、培養液が多孔性担体と接触しながら流通していく間に肝細胞が多孔性担体の表面又はその孔の内部表面に自然に付着し、そこで増殖する。培養液に添加する肝細胞の密度は、特に限定されないが、通常 $10^5 \sim 10^9$ 細胞/ml 程度、好ましくは $10^6 \sim 10^7$ 細胞/ml 程度であり、また、培養液に添加する肝細胞の総数は、バイオリアクター本体の容積に応じて適宜選択されるが、例えばバイオリアクター本体12内の容積が200 ml の場合には通常 $10^7 \sim 10^{10}$ 個程度、好ましくは $10^8 \sim 10^9$ 個程度が適当である。なお、肝細胞を添加した培養液がバイオリアクター本体内に行き渡った後、3時間～12時間程度は、培養液の流通を止め、肝細胞のバイオリアクター本体からの流出を防い

で肝細胞の担体上への付着を促進することが好ましい。

【0014】

用いる肝細胞は、剖検等によりヒトの肝臓から採取したものを公知の平板培養法等により培養して増殖させたものであってもよいが、長期間にわたって確実にバイオリアクター内での増殖、維持を達成するために肝細胞の樹立細胞株を用いることが好ましい。肝細胞の樹立細胞株自体は公知であり、公知のいずれの細胞株をも用いることができる。好ましい細胞株の例として、FLC-4（米国特許第5,804,441号、FERM BP-5165の受託番号で生命工学工業技術研究所に寄託）、HepG2（ATCCより入手可能）、Huh7（Japanese Cancer Research Resources Bank（JCRB）より入手可能）、FLC-1、FLC-2、FLC-3、FLC-5、FLC-6及びFLC-7（これらFLCシリーズの株細胞は、K. Fujise, S. Nagamori, H. Kameda et al.: Integration of hepatitis B virus DNA into cells of six established human hepatocellular carcinoma cell lines, HEPATOLOGY, 8: 1425, 1988; 永森静志, 他、培養細胞の株情報; 培養細胞株の紹介（肝・胆・脾）HUMAN CELL 1(1):106, 115-118, 120, 123, 1988; 永森静志ほか、人工肝補助装置の開発、カレントセラピー16:158-162, 1998; Kawada, M. et al.: Massive culture of human liver cancer cells on a newly developed radial flow bioreactor system, In Vitro Cell. Dev. Biol., 34:109-115, 1998; 蓮村 哲 ほか: ヒト由来肝癌細胞を用いたラジアルフロー型バイオリアクターによるアルブミン大量生産. 人工血液, 5:33-37, 1997; 及び永森静志編: 特集 人工肝臓への道—肝細胞とバイオリアクターの進歩, 23:2-43, 1997に記載）等を挙げることができるがこれらに限定されるものではない。本願発明者が、複数種類の肝細胞株について、HCVの増殖性を比較検討したところ、FLC-4細胞中でHCVが最も良く増殖したので、FLC-4細胞を用いることが好ましい。FLC-4細胞中には、HCVのミニゲノムRNAを特異的に安定化させ翻訳効率を上昇させる何らかの宿主因子が存在すると考えられる。

【0015】

肝細胞を供給後、通常5～15日間培養すると、肝細胞が十分に増殖して肝炎ウイルスを感染させるのに好ましい状態となる。肝細胞は、バイオリアクター本体内で約 $10^8$ 細胞/■1以上にまで増殖する。バイオリアクター本体12内の容積

が 200 ml の場合に、肝細胞は総数で約  $2.9 \times 10^{10}$  まで増殖する。

【0016】

肝細胞を増殖後、肝炎ウイルスを感染させる。本発明の方法により、A型、B型、C型、D型、E型、G型のようないずれの肝炎ウイルスをも増殖させることができ、特にHCVが好ましい。本発明の方法によれば、異なる型や、同じ型の異なる株系の複数のウイルスを同時に増殖させることも可能である。肝炎ウイルスの感染は、例えば慢性肝炎患者の血清を供給培養液中に含めて培養液として供給することにより行うことができる。肝炎ウイルスを含む培養液を、バイオリアクター本体内の肝細胞に直接添加することにより感染の可能性をより高めることができる。供給する肝炎患者血清の量としては、特に限定されないが、バイオリアクター本体の容積の  $1/50 \sim 1/10$  程度が適当である。あるいは、肝炎ウイルスを肝細胞内で構築することができる、肝炎ウイルスの感染性 cDNA クローンを注入することもできる。従って、本発明において「肝炎ウイルスを感染させる」ことには、完全な肝炎ウイルス粒子を感染させることのみならず、肝細胞内で肝炎ウイルスを構築できる核酸を発現する、感染性を有する組換えベクターを感染させることも包含される。なお、肝炎ウイルス含有培養液を供給した後、好ましくは2時間～24時間程度、さらに好ましくは2～10時間程度は、新たな培養液の供給及び培養液の循環を停止し、さらにその後好ましくは2時間～48時間程度、さらに好ましくは6～48時間程度は新たな培養液の供給を行わずにバイオリアクター本体12の頂部から排出された培養液を再度バイオリアクター本体12に培養液として供給することが好ましい。このようにすることにより肝炎ウイルスが感染する可能性を高めることができる。また、肝炎ウイルスを感染させる直前15分間～4時間程度、さらに好ましくは30分間～2時間程度、それまでの新鮮培地供給速度及び酸素供給速度を1.5倍～4倍程度、さらに好ましくは1.5倍～2.5倍程度に増加させて培養することが好ましい。このようにすることにより肝炎ウイルスが感染する可能性を高め、かつ細胞の状態を良好に保つことができる。また、肝細胞の培養開始後、酸素消費量がバイオリアクター本体の容積の半分の  $ppm \pm 30\%$  (例えば、バイオリアクター本体内の容積が30 ml の場合には15  $ppm \pm 30\%$ ) 程度になった時点で培養温度を徐々に下げ、酸素消費量

が安定した後上記のようにウイルスを感染させることがウイルス感染の確率を高める上で好ましい。この際、培養温度は28℃～34℃が好ましく、さらに好ましくは29℃～32℃程度である。また、ウイルス感染後の培養も、このような低温下で行うことが、ウイルス感染を持続し、細胞の状態を良好に保つ上で好ましい。

#### 【0017】

上記の肝炎ウイルス感染処理後、上記した条件で肝細胞の培養を続けることにより、肝炎ウイルスが肝細胞内で増殖し、感染後2～3週間程度で培養液排出管20から排出される培養液中に肝炎ウイルスが含まれるようになる。従って、排出される培養液から肝炎ウイルスを回収することにより肝炎ウイルスを分離することができる。培養液からの肝炎ウイルスの分離は、限外ろ過膜を用いたろ過や、遠心分離、ゲルろ過クロマトグラフィー等の常法により行うことができる。

#### 【0018】

回収された肝炎ウイルスは、ワクチンの開発や、抗肝炎ウイルス抗体を誘導するための免疫原として利用することができる。また、上記した培養肝細胞中での肝炎ウイルスの増殖系は、肝炎ウイルスの回収のみならず、プロテアーゼ阻害剤やアンチセンスRNA若しくはアンチセンスDNA等の肝炎治療薬の開発に利用することも可能である。

#### 【0019】

##### 【実施例】

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

#### 【0020】

##### (1) ラジアルフロー型バイオリアクター

図1に示す構造を有するラジアルフロー型バイオリアクターを準備した。バイオリアクター本体12及び培養液排出管20は、直径約40μmの貫通孔を有する多孔性の金属焼結材料から成るものであった。バイオリアクター本体12内の容積は30mlであった。バイオリアクター本体12内に充填した多孔性担体は、多孔性ガラスビーズ（商品名Siran, ドイツ国Schott glasswerk Co. Ltd.）で

あった。このガラスビーズの直径は0.6 mm、内部は蜂巢状に孔が空いており、空隙率は50%、表面積は $90\text{m}^2/\text{L-matrix}$ 、孔径は $20\sim 120\mu\text{m}$ であった。このようなガラスビーズをバイオリアクター本体12内に18g充填した。従って、細胞接着面積は $1500\text{cm}^2/\text{g-matrix}$ であった。

【0021】

## (2) 培養システム

本実施例で採用した、上記のようなラジアルフロー型バイオリアクターを含む培養システムを図2に模式的に示す。図2に示すシステムにおいて、新鮮な培養液は新鮮培養液貯蔵容器24内に蓄えられており、ポンプ26により培養液調整槽28内に移送される。培養液調整槽28には攪拌機30が備えられており、ここで培養液の酸素濃度、二酸化炭素濃度及びpHが調整される。なお、培養液調整槽28を載せている台31には加熱手段が設けられており、培養液の温度を調整することができる。NaOH貯蔵容器32内には1N NaOH溶液が蓄えられており、必要に応じてポンプ34により培養液調整槽28内に移送され、培養液のpHが調整される。一方、酸素ポンプ36及び二酸化炭素ポンプ38が流量コントローラ40を介して培養液調整槽28に接続されている。酸素ポンプ36及び二酸化炭素ポンプ38から、それぞれ酸素及び二酸化炭素が必要量だけ培養液調整槽28に供給される。流量コントローラ40はマイクロコンピューター42に接続されており、該マイクロコンピューターにより、流量が20分に一度の割合でチェックされ、制御される。培養液調整槽28内で酸素濃度、二酸化炭素濃度及びpHが調整された培養液は、ポンプ44によりラジアルフロー型バイオリアクター10に底部から供給される。供給された培養液は、図1に基づいて説明したように、ラジアルフロー型バイオリアクター10の培養液排出管の頂部から排出される。排出された培養液はポンプ46により排出培養液貯蔵容器48に蓄えられる。なお、図2に示す培養システムでは、排出された培養液を培地調整槽28に戻す経路も設けられており、排出培養液の全部又は一部を、必要に応じて培養液として再度供給することも可能な構成となっている。なお、図示してはいないが、マイクロコンピューター42は、各ポンプと接続され、また、バイオリアクター本体に供給される培養液を測定する図示しない酸素濃度計及び排出された培養

液の酸素濃度を測定する図示しない酸素濃度計とも接続され、さらに培養液調整槽 28 内に備えられた図示しない pH メーター及び温度計とも接続されており、培養液の酸素濃度、pH、温度、培養液の供給量はマイクロコンピューター 42 により自動制御される。

## 【0022】

## (3) 肝細胞の播種及び培養

樹立肝細胞株である上記 FLC-4 株を  $2 \times 10^9$  個までフラスコ内で継代培養した。培養液をバイオリアクター本体内に流通させた後、フラスコ内で培養した FLC-4 細胞を培養液に加え、バイオリアクター本体内に供給することにより肝細胞の播種を行った。播種後 6 時間は、ポンプ 44 及び 46 を停止して細胞のバイオリアクター本体内からの流出を防いだ。その後は、25 ml/日の流量で新鮮な培養液を供給した。また、培養液の循環速度は 10～40 L/日であった。培養液の pH は 7.0、温度は 37℃、酸素濃度は排出培養液中の酸素濃度が 1～6 ppm となるようにコンピューターにより自動制御した。なお、培地は第 12 段落に上記した組成の培地にウシ胎児血清を 2% 添加したものをを用いた。培養液中の酸素やグルコース消費量の増加により、細胞の活動性が確認され、順調に酸素消費量の増大が認められた。なお、ここで、酸素消費量は、バイオリアクター本体 12 に供給される培養液中の酸素濃度と、バイオリアクター本体 12 の頂部から排出される培養液中の酸素濃度との差から求めた。また、グルコース消費量は、排出された培養液中のグルコース濃度を市販のグルコース濃度測定キットを用いて測定し、この濃度と供給培養液中のグルコース濃度との差から求めた。

## 【0023】

## (4) HCV の感染

リアクターによる培養開始 7 日目に酸素消費量が 15 ppm に達し、この時点で培養温度を徐々に 32℃ に下げた。細胞の酸素消費量が安定した培養開始 9 日目に HCV の感染を行った。HCV の感染を行う前に培養液供給量及び酸素供給量を 2 倍に増加させて 1 時間培養した。その後、HCV の感染を行った。HCV の感染は、慢性 C 型肝炎患者の血清 (チンパンジーに対する感染価が  $5.5 \text{ CID}_{50}/\text{ml}$ ) 1 ml を 10 ml の培養液に溶解したものを培養液として、バイオリアクター本体頂

部直後の培養液循環チューブから分枝し、バイオリアクター本体内に連通する図示しない管からバイオリアクター本体内に供給することにより行った。その後6時間にわたりポンプを停止した。次いで、循環ポンプ44を起動させたが、バイオリアクター10の頂部から排出された培養液の全量を培養液調製槽28に戻し、新たな培地の供給を行うことなく24時間培養した。その後、上記と同様にして(ただし、培養温度は29~32℃)培養を継続した。

## 【0024】

## (5) 排出培養液中のHCVの検出

HCV感染処理後、上記した通常の条件で培養を再開してから毎日排出培養液中のHCVを常法であるRT-PCRにより検出した。ここで、逆転写に用いたプライマーの塩基配列は、AACACTACTCGGCTAGCAGTであり、また、PCRに用いたプライマーの塩基配列は、第1回目がCTGTGAGGAAGTCTGTCTT及びAACACTACTCGGCTAGCAGTであり、第2回目がTTCACGCAGAAAGCGTCTAG及び GTTGATCCAAGAAAGGACCCであった。また、PCRは、全量を50 $\mu$ lとし、変性工程を94℃、45秒間、アニーリング工程を55℃、45秒間、伸長工程を70℃、60秒間として35サイクル行った。

## 【0025】

その結果、感染処理後1~2日は、HCVが検出されたが、その後検出されなくなり、16日目から再度検出されるようになり、50日間に至るまでずっと検出された。感染処理後1~2日にHCVが検出されたのは、添加したHCVが流出してきたものが検出されたと考えられる。感染処理後3日目から検出されなくなったのは、添加したHCVの流出が終了したものと考えられる。そして、16日目以降に再度検出されるようになったのは、肝細胞に感染したHCVが肝細胞中で増殖し、この増殖したHCVが培養液中に放出されたものと考えられる。

## 【0026】

以上のように、上記の方法により、HCVが培養液中に検出できるほど効率良く増殖したことが確認された。

## 【0027】

## 【発明の効果】

本発明により、培養細胞を用いて、生体外でHCVを効率良く増殖させる方法が初めて提供された。本発明の方法によれば、排出培養液中にHCVを得ることができる。従って、本発明は、従来治療に用いられてきたインターフェロンの効果予測はもちろん、HCVワクチンの開発、抗HCV抗体の調製、プロテアーゼ阻害剤、ポリメラーゼ阻害剤やアンチセンス薬剤等のHCV治療薬の開発等到大いに貢献するものと期待される。

【0 0 2 8】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Seishi NAGAMORI

<120> Method for Proliferating Hepatitis Virus and Apparatus Therefor

<130> 99603

<160> 5

【0 0 2 9】

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> primer used for synthesizing cDNA of hepatitis C virus by reverse transcription

<400> 1

aacactactc ggctagcagt 20

【0 0 3 0】

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> primer used for amplifying by PCR hepatitis C virus cDNA

<400> 2

ctgtgaggaa ctactgtctt 20

【0 0 3 1】

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> primer used for amplifying by PCR hepatitis C virus cDNA

<400> 3

aacactactc ggctagcagt 20

【0 0 3 2】

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> primer used for amplifying by PCR hepatitis C virus cDNA

<400> 4

ttcacgcaga aagcgtctag 20

【0 0 3 3】

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> primer used for amplifying by PCR hepatitis C virus cDNA

<400> 5

gttgatccaa gaaaggaccc 20

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明の方法に用いられるラジアルフロー型バイオリアクターの縦断面及び横断面を模式的に示す図である。

【図 2】

本発明の実施例で採用した培養システムを模式的に示す図である。

【符号の説明】

1 0 ラジアルフロー型バイオリアクター

1 2 バイオリアクター本体

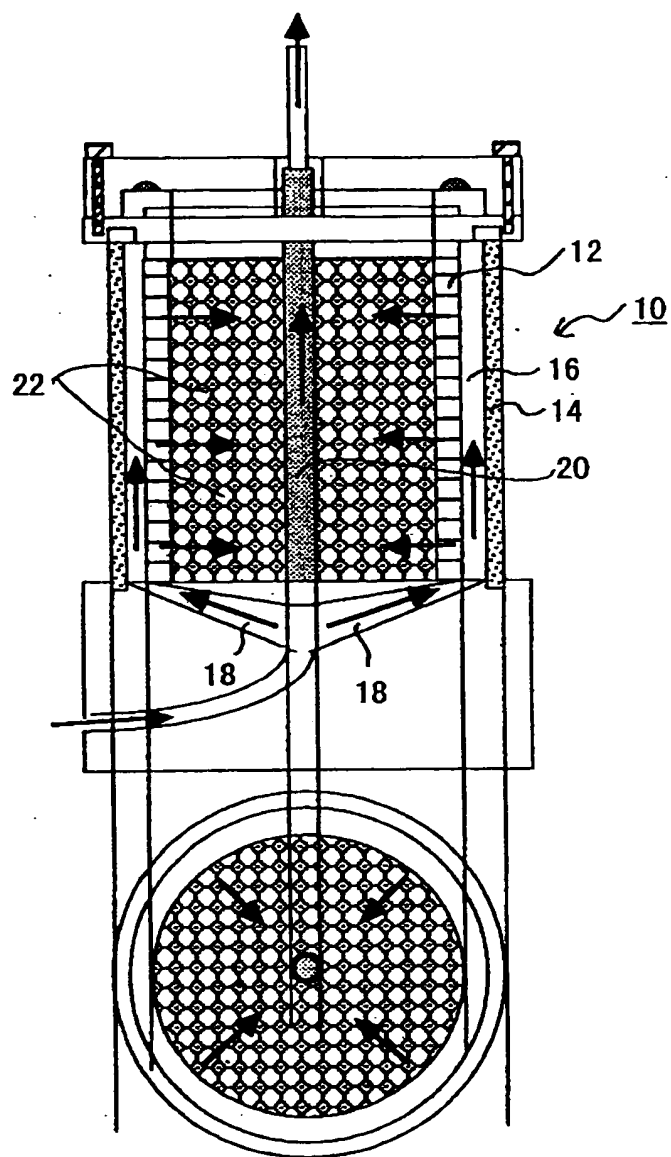
1 4 ケーシング

- 1 6 培養液供給路
- 1 8 培養液供給管
- 2 0 培養液排出管
- 2 2 多孔性担体
- 2 4 新鮮培養液貯蔵容器
- 2 6 ポンプ
- 2 8 培養液調整槽
- 3 0 攪拌機
- 3 1 台
- 3 2 NaOH貯蔵容器
- 3 4 ポンプ
- 3 6 酸素ポンベ
- 3 8 二酸化炭素ポンベ
- 4 0 流量コントローラー
- 4 2 マイクロコンピューター
- 4 4 ポンプ
- 4 6 ポンプ
- 4 8 排出培養液貯蔵容器

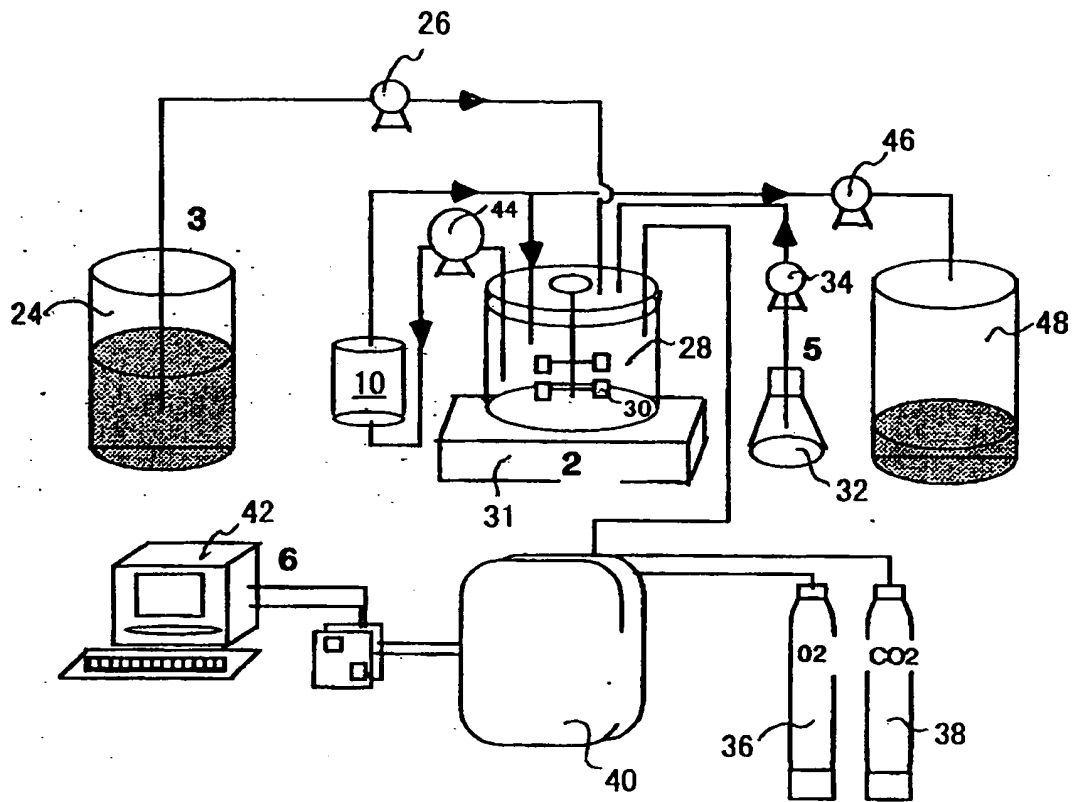
【書類名】

図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 培養肝細胞を用いた、H C V等の肝炎ウイルスの増殖方法を提供すること。

【解決手段】 粒子状の多孔性担体上に肝細胞を担持させたものを収容するバイオリアクター本体の周縁部から中心部に向けて培養液を流通させるラジアルフロー型肝細胞バイオリアクター中に維持された前記肝細胞に肝炎ウイルスを感染させ、引き続きバイオリアクター本体の周縁部から中心部に向けて培養液を流通させて前記肝細胞を培養し、それによって前記感染された肝炎ウイルスを前記肝細胞中で増殖させることを含む、肝炎ウイルスの増殖方法を提供した。

【選択図】 図 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 5 9 9 1 1 7 2 7 7 ]

1. 変更年月日      1 9 9 9 年    8 月 2 0 日

    [変更理由]      新規登録

        住 所      東京都港区西新橋三丁目 2 5 番 8 号    東京慈恵会医科大学内

        氏 名      永森    静志

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [599117288]

1. 変更年月日 1999年 8月20日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都新宿区戸山一丁目23番1号 国立感染症研究所内  
氏 名 宮村 達男